

**Der Einfluß der akuten Thioacetamid-
Vergiftung auf das Spektrum der freien
Plasma-Amino-Säuren normaler und
mit Phospholipiden vorbehandelter Ratten**

Eva M. Hardy

=

1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Der Einfluß der akuten Thioacetamid-
Vergiftung auf das Spektrum der freien
Plasma-Amino-Säuren normaler und
mit Phospholipiden vorbehandelter Ratten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eva M. Hardy
Los Angeles (Calif.)

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv. -Doz. Dr. H. -G. KNAUFF
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan:	Prof. Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 20.2.1964



GEWIDMET

HERRN PROF. Dr. WOLFGANG GRASSMANN
DER MEIN ERSTER BIOCHEMIELEHRER WAR
UND MICH MIT DEM BEGRIFF AMINOSÄURE
VERTRAUT GEMACHT HAT

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINFÜHRUNG	5
METHODIK	6
A. Versuchstiere und Materialgewinnung	6
B. Elektrophorese	8
C. Papierchromatographie und quantitative photometrische Auswertung	10
a) Materialien	11
b) Technisches Vorgehen	14
ERGEBNISSE	16
A. Biochemische Befunde	16
a) Normaltiere (Serie I)	16
b) Mit Thioacetamid behandelte Tiere (Serie II)	16
c) Mit Thioacetamid und essentiellen Phospholipiden behandelte Tiere (Serie III)	17
B. Histologische Ergebnisse	18
DISKUSSION	21
A. Thioacetamid-Vergiftung	21
B. Thioacetamid-Vergiftung unter gleichzeitiger Behandlung mit Phospholipiden	25
ZUSAMMENFASSUNG	28
LITERATURVERZEICHNIS	30

EINFÜHRUNG

Da die Leber im intermediären Aminosäurestoffwechsel eine zentrale Stellung einnimmt (1-6), ist es nicht verwunderlich, dass bei vielen Lebererkrankungen das normalerweise relativ konstante Spektrum der freien Plasmaamino-säuren erhebliche Veränderungen erfährt.

Allerdings sind die in der Literatur darüber angegebenen Werte keineswegs einheitlich (7-17). Insbesondere ist es bis heute nicht gelungen, Korrelationen zwischen bestimmten Leberschäden und Abweichungen des normalen Spektrums der freien Plasmaamino-säuren zu finden. Da uns tierexperimentelle Leberschäden infolge des einheitlicheren Materials eindeutigere Ergebnisse versprochen als klinische Untersuchungen, haben wir zunächst bei diesen das Verhalten der freien Plasmaamino-säuren untersucht. Leider ist beim Versuchstier keine den menschlichen Lebererkrankungen vergleichbare Erkrankung bekannt. Man ist hier auf durch hepatotoxische Substanzen erzeugte Leberschäden angewiesen. Der Aussagewert solcher Untersuchungen ist aber wegen der grossen Unterschiede zwischen diesen und menschlichen Lebererkrankungen nur begrenzt. Vielleicht bietet aber die Synopsis dieser Einzeluntersuchungen die Möglichkeit zu einer grundsätzlichen Aussage.

Die Aminosäureveränderungen bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung sind von KNAUFF und WINDSHEIMER (18) untersucht worden. Wir wählten in unseren Experimenten als hepatotoxische Substanz das Thioacetamid. Während Tetrachlorkohlenstoff auch andere Organe, besonders die Niere, beeinträchtigt, schädigt Thioacetamid fast elektiv das Leberparenchym (19, 20, 21). Dabei ähnelt der histologische Befund der akuten Thioacetamid-Vergiftung dem der toxisch bedingten Hepatitis (21, 22). Der genaue Wirkungsmechanismus, insbesondere der primäre Angriffspunkt (23, 24) des Thioacetamids an den Zellstrukturen ist allerdings noch unklar.

Gleichzeitig sollte die zusätzliche Fragestellung geklärt werden, inwieweit gewisse, aus Sojabohnen gewonnene Phospholipide, die sich durch einen besonders hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten, essentiellen Fettsäuren auszeichnen, imstande sind, die durch hepatotoxische Substanzen erzeugten Leberfunktionsstörungen, soweit sie sich in Veränderungen des Spiegels der freien Plasmaamino-säuren ausdrücken, zu kompensieren. Diese sog. "essentiellen Phospholipide" (EPL) sind in die klinische Therapie eingeführt und werden zur Behandlung von Glomerulonephritiden, Strahlenschäden, Atherosklerose, hauptsächlich aber von Lebererkrankungen empfohlen (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

METHODIK

Die Ausarbeitung geeigneter Methoden für die quantitativen Analysen bildete einen Hauptteil der experimentellen Arbeit. Da die Plasmamenge, die von einem Tier gewonnen werden konnte und die somit für die Analyse der freien Plasmaamino-säuren zur Verfügung stand, maximal nur etwa 4 ml betrug, musste mit grösster Sorgfalt gearbeitet werden. Diese 4 ml Blutplasma enthalten, wie WINDSHEIMER (18) nachgewiesen hat, nur $1,4 \mu\text{Mol}$ Aminosäuren, entsprechend einer Konzentration von $0,4 \mu\text{Mol}$ Aminosäuren pro ml. Neue Methoden der Elektrophorese und der Papierchromatographie sowie der photometrischen Auswertung von Chromatogrammen ermöglichen jedoch eine genaue Bestimmung auch bei so niedrigen Konzentrationen und kleinen Substanzmengen.

A. VERSUCHSTIERE UND MATERIALGEWINNUNG

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen insgesamt 112 Sprague-Dawley-Albinoratten aus einheitlichem Laborstamm im Gewicht von 180-220 g. Die Versuchstiere wurden einheitlich mit Altromin-Altroge gefüttert und bekamen Futter und Wasser bis zur Tötung ad libidum.

Zur Ausarbeitung und Standardisierung der Analysemethoden benötigten wir 52 Tiere. Die eigentlichen 60 Versuchstiere wurden in 3 Serien zu je 20 Tieren eingeteilt (vgl. Tab.I). Serie I bildete die nicht vergiftete, gesunde Kontrollgruppe. Die Ratten der Serie II erhielten 7 Tage lang täglich 25 mg TAA/kg Körpergewicht durch die Schlundsonde. Serie III erhielt neben dieser TAA-Menge dreimal 200 mg EPL intraperitoneal gespritzt. Die EPL-Fraktion wurde dazu in Aqua dest. in einer Konzentration von 200 mg/ml suspendiert. Nicht bei allen Versuchstieren konnten die Aminosäuren bestimmt werden. Einige Tiere sind vor Beendigung der Versuche spontan gestorben. Bei anderen konnte nicht genügend Blutplasma gewonnen werden. Bei einigen weiteren Tieren gingen die Plasmaextrakte infolge technischer Mängel bei der Aufbereitung verloren. Eine genaue Aufschlüsselung der einzelnen Serien findet sich in Tabelle I.

7 Tage nach Applikation des Giftes wurde unter leichter Äthernarkose bei den Tieren die Bauchhöhle eröffnet und die vena cava inferior frei präpariert. Durch Punktion derselben mit Heparin-betzter Spritze und feiner Nadel konnten etwa 6-8 ml Blut gewonnen werden. Das Blut wurde sofort in der Kühlzentrifuge bei 5°C 10 Minuten lang bei 2500 U/min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde daraufhin sorgfältig mit einer Saugpipette abgesaugt. Orientierenden Voruntersuchungen hatten ergeben, dass zur sicheren quantitativen Aminosäu-

reanalyse mindestens 4 ml Plasma erforderlich waren. Bei der Abheberung des Plasmas wurde besonders darauf geachtet, dass die Leukozyten, die die oberste Schicht der sedimentierten Formbestandteile bildeten, nicht aufgerührt wurden.

Das so gewonnene Plasma wurde anschliessend mit der vierfachen Menge vorgekühlten Acetons enteiweisst und der flockige Eiweiss- und Salzniederschlag bei -2°C 20 Minuten lang bei 15000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und der verbliebene Rückstand noch einmal mit der gleichen Menge Aceton und einem Zehntel der ursprünglichen Plasmamenge 0,1 n HCl versetzt und gut aufgerührt. Die 0,1 n HCl diente dabei der Verbesserung der Löslichkeit der im Rückstand verbliebenen Aminosäuren. Unter gleichen Bedingungen wie das erste Mal wurde nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und das Aceton im Vakuum ausgetrieben. Wir verwendeten dazu die Brücke und achteten darauf, dass die Temperatur des Wasserbades 50°C nicht überstieg.

	Bezeichnung der Serie		
	I	II	III
Ursprüngliche Anzahl der Versuchstiere	20	20	20
Davon spontan gestorben	-	4	3
Zahl der ausgewerteten Versuche	10	11	14
Gesamtdosis EPL in mg/kg Körpergewicht			0,6
Gesamtdosis TAA in mg/kg Körpergewicht		175	175

TABELLE I
Übersicht über die Versuchserien

Die Tabelle gibt die Zahl der in den Versuch genommenen und der spontan gestorbenen Tiere wieder. In Zeile 3 findet sich die Zahl der jeweils ausgewerteten Versuche (wegen der Schwierigkeit und Aufwendigkeit der Methodik konnten nicht von allen überlebenden Tieren exakte Werte gewonnen werden), darunter die Gesamtdosis des mittels Schlundsonde verabreichten Thioacetamids in mg/kg Körpergewicht sowie für Serie III die Gesamtdosis der intraperitoneal verabreichten essentiellen Phospholipide (EPL).

Nach Abdampfen des Acetons setzten wir die Prozedur so lange fort, bis das verbleibende Substrat auf etwa 2,5 ml eingeengt war. Zur Entfernung der

Lipoide wurde dasselbe dreimal mit jeweils 5 ml Äther ausgeschüttelt. Nach der letzten Extraktion mussten die in der wässrigen Phase verbliebenen Ätherspuren sorgfältig abgedampft werden. Die so erhaltene wässrige Lösung wurde zur Aminosäurebestimmung verwendet.

Für die histologischen Untersuchungen wurde bei sämtlichen Tieren die Leber in frischem Zustand entnommen. Die Fixierung erfolgte in einer 4 %igen wässrigen Formalinlösung sowie in 96 %igem Alkohol. Von sämtlichen Lebern wurden an Paraffinschnitten Hämatoxylin-Eosinfärbungen und Bindegewebsfärbungen nach van GIESON sowie an Gefrierschnitten Fettfärbungen mit Sudanrot nach ROMEIS angefertigt.

B. ELEKTROPHORESE

Methodische Vorarbeiten, die auf früheren Untersuchungen (33, 34) aufbauten, hatten gezeigt, dass die Trennung der 21 Aminosäuren allein mit Hilfe der Papierchromatographie nicht immer zufriedenstellend war. Die Banden einzelner Aminosäuren überschnitten sich und es konnte keine ausreichend sichere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielt werden. Es erschien deshalb zweckmässig, zunächst durch Gruppentrennung die sauren, basischen und neutralen Aminosäuren jeweils voneinander zu trennen.

Eine brauchbare Methode zur Gruppentrennung wurde von GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL (35) beschrieben. Sie benutzten die von GRASSMANN entwickelte (36, 37) fortlaufende Papierelektrophorese. Diese eignet sich hervorragend zur präparativen Trennung von Gemischen polarer Substanzen. Gegenüber anderen papierelektrophoretischen Methoden hat sie den Vorteil, dass Substanzen mit verschiedenen Laufgeschwindigkeiten jeweils ihre eigene Laufstrecke haben und sich somit nicht gegenseitig überschneiden. Gleichzeitig gestattet sie eine verlustlose und vollständige Entsalzung. Wir benutzten den nach diesen Prinzipien gebauten Apparat für präparative Durchlauf-Elektrophorese (36, 37, 38, 39, 40, 41) (Elphor V II A von Bender und Hobein, München, Lindwurmstrasse). Das Trägerpapier wird in diesem Apparat zwischen 2 senkrechte Säulen gespannt, die gleichzeitig über die ganze Länge des Papiers als Elektroden dienen. Ein entsprechender Puffer fliesst von oben gleichmässig durch das Blatt. Auf diese Weise liegt das elektrische Feld senkrecht zur Laufrichtung. Das zu analysierende Gemisch wird mittels einer Dosierpumpe kontinuierlich durch eine Glasdüse (Applikator) in der Mitte auf den oberen Teil des Filterpapiers aufgebracht. Die elektrisch neutralen Substanzen werden senkrecht niedergetrieben, alle polaren Stoffe entweder zur Anode oder zur Kathode hin abgelenkt. Von dem gezipfel-

ten unteren Rand des Trägerpapiers tropft das Gemisch aus Puffer und Fraktionen in 42 nebeneinanderstehende Spezialgläschen von je 2 ml Inhalt. Die Handhabung und Bedienung des Elphor V II A war relativ einfach und bereitete keine Schwierigkeiten. Wir verwendeten als Pufferlösung ein wässriges Eisessig-Pyridin-Gemisch von pH 3,9 (100 ml Eisessig + 30 ml Pyridin mit Aqua dest. auf 8 Liter aufgefüllt (42)). Dieser Puffer hat den Vorteil, dass die Fraktionen nach dem Verdampfen der Flüssigkeit salzfrei sind (35). Das Trägerpapier (Filterpapier Schleicher und Schüll 2043 a) und die Auftragsgeschwindigkeit des zu trennenden Substrats (0,54 ml/Stunde) entsprachen den Anweisungen für den Elphor V II A. Die dort empfohlene Spannung von 200 V musste erhöht werden, da dabei die 3 Fraktionen nicht genügend scharf getrennt wurden. Erst bei 350 V war die Trennung ausreichend.

Zur Ausarbeitung und Standardisierung der Methode benutzten wir anfangs Aminosäuretestlösungen, deren Konzentration ungefähr der Aminosäurekonzentration des Plasmas von Ratten entsprach (43). Später nahmen wir Plasma gesunder Ratten. Zur Kontrolle der elektrophoretischen Trennung brachen wir einige der laufenden Analysen vorzeitig nach 5-stündiger Laufzeit ab und färbten das Trägerpapier mit Ninhydrin an. Wir erhielten dabei die Bestätigung, dass die Aminosäurebanden die erwartete Strecke zurückgelegt hatten. Die neutrale Fraktion verlief zentral senkrecht, während die saure Fraktion auf die Anode und die basische auf die Kathode zulief. Der Abstand zwischen den Banden der drei Fraktionen schloss eine Überschneidung aus.

Der routinemässige Arbeitsablauf während der eigentlichen Analyse gestaltete sich folgendermassen: Im eingeschalteten Elphor-Apparat bespülte die Pufferlösung 3 Stunden lang das Trägerpapier und die Elektroden, bevor das aufgearbeitete Plasmasubstrat eingebracht wurde. Auf diese Weise wurden lösliche Verunreinigungen vom Filterpapier entfernt und in der Elektrophoresekammer Dampfsättigung erreicht. Das Plasmasubstrat (2,5 ml + eine geringe Menge Pufferlösung, mit der das Gefäss gespült wurde) zogen wir quantitativ in eine 10 ml-Glasspritze auf, die über einen Gummischlauch an den Applikator angeschlossen wurde. Die Auftragsgeschwindigkeit betrug 0,54 ml/Stunde und wurde automatisch mittels Dosierpumpe konstant gehalten. Eine Fraktionierung dauerte durchschnittlich 8 bis 10 Stunden. Die in den 42 Sammelgefässen aufgefangene Flüssigkeitsmenge betrug jeweils etwa 1,5-2,0 ml. Um die einzelnen Fraktionen genau in den numerierten Sammelgefässen zu lokalisieren, wurden mit einer Mikropipette aus jedem Gefäss 0,01 ml entnommen und auf einen Streifen Chromatographiepapier punktförmig unter ständigem Trocknen mit dem Föhn aufgetragen. Nach Anfärbung des Papiers mit Ninhydrin liess sich die Lage der drei Fraktionen ermitteln (Abb. 1).

Geringe Abweichungen in der Lokalisation zwischen den einzelnen Analy-

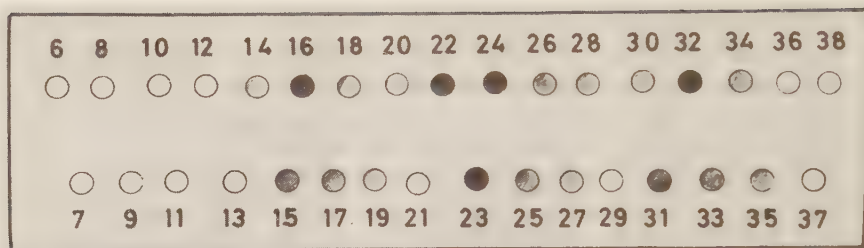


ABBILDUNG 1

Lokalisation der drei Aminosäure-Fractionen in den 42 Sammelgefäßen des El-phor V II A nach Auftrag von je 0,01 ml des aufgefangenen Substrats auf einen Chromatographie-Papierstreifen und anschliessender Ninhydrinfärbung. Die saure Fraktion befand sich im allgemeinen in den Gläsern 14-18, die neutrale in den mittleren Gläsern 19-27 und die basische Fraktion in den Gläsern 28-35.

sen waren nicht zu vermeiden, da uns kein Raum mit konstanter Temperatur zur Verfügung stand.

Der Inhalt der Gefäße, die jeweils eine Fraktion enthielten, wurde vereinigt, im Vakuum-Exsikkator über Phosphorpentoxyd zur Trockene eingengt und dann mit 0,3 ml 0,1 n HCl wieder aufgenommen. Diese Lösung wurde zur Papierchromatographie verwendet. Zum Schutz gegen Eindampfen wurde sie in kleinen, gut verschlossenen Fläschchen im Kühlschrank aufbewahrt.

C. PAPIERCHROMATOGRAPHIE UND QUANTITATIVE PHOTOMETRISCHE AUSWERTUNG

Bei früheren quantitativen Aminosäureanalysen wurden zur Bestimmung aller 21 Aminosäuren drei verschiedene, jeweils in anderen Laufmitteln entwickelte Chromatogramme benötigt (18). Da wir die elektrophoretische Gruppentrennung der freien Plasmaamino-säuren vorangehen liessen, musste die papierchromatographische Methodik etwas verändert werden. Einleitende Versuche dienten daher der Erprobung verschiedener zusammengesetzter Chromatographie-lösungen. Die Trennung der basischen und der sauren Fraktion war dabei relativ einfach. Zur Trennung der neutralen Fraktion musste jedoch eine andere Methode angewendet werden.

a) Materialien

1. Papier Zur Chromatographie aller drei Fraktionen verwendeten wir das Chromatographiepapier von Schleicher und Schüll 2043 b MGL. Zur Trennung der neutralen Fraktion wurde ein Chromatographiebogen von der Grösse 520 x 124 mm durch zwei Einschnitte in Längsrichtung in je drei parallele Streifen von 38 mm Breite unterteilt. Die Chromatographie der sauren und basischen Fraktionen erfolgte auf 400 x 190 mm grossen, in gleicher Weise durch Einschnitte in vier parallele Streifen unterteilten Papierbogen.
2. Laufmittel Von der neutralen Fraktion wurden jeweils zwei Chromatogramme angefertigt, die in den folgenden beiden Laufmitteln entwickelt wurden:
Lösung I: Isopropanol - Eisessig - Wasser (70 : 15 : 15)
Lösung II: Isoamylalkohol - n-Butanol - Ameisensäure - Wasser (3 : 4 : 1 : 1)
Für die sauren Aminosäuren verwendeten wir als Laufmittel die
Lösung III: Isoamylalkohol - Eisessig - Wasser (70 : 15 : 15)
Die basischen Aminosäuren wurden durch aufeinanderfolgende Anwendung zweier verschiedener Gemische chromatographiert:
Lösung IV: n-Butanol - Eisessig - Wasser (4 : 1 : 5)
Lösung V: (entspricht Lösung I)
Isopropanol - Eisessig - Wasser (70 : 15 : 15)
3. Chromatographiekammern Die neutrale Fraktion trennten wir in einer vom Max-Planck-Institut für Leder- und Eiweissforschung in München (Direktor: Prof. Dr. W. Grassmann) entwickelten Horizontalkammer für eindimensionale Chromatographie (44) (Abb. 3), Hersteller: Bender und Hobein, München. Bei dieser Methode ist das unterschiedliche spezifische Gewicht der verschiedenen Komponenten des Laufmittelgemisches ohne Bedeutung. Dadurch werden schärfere Trennungen erzielt als bei der aufsteigenden oder der absteigenden Chromatographie. Die saure und die basische Fraktion chromatographierten wir eindimensional aufsteigend in einfachen, luftdicht verschlossenen Glasbehältern.
4. Testlösungen Die Testlösungen enthielten die angegebenen 21 Aminosäuren in plasmaähnlichen Konzentrationen. Die Aminosäuren wurden in kristalliner Form eingewogen und anschliessend in 0,1 n HCl gelöst. Die Aufbewahrung erfolgt in gut verstöpselten Glasflaschen im Kühlschrank bei 4°C. Eine Testlösung wurde nie länger als 2 Monate aufbewahrt und verwendet.
5. Anfärbung der Chromatogramme Wir verwendeten dazu die Ninhydrinlösung nach Bode: 0,5 g Ninhydrin, 100 ml Aceton, 50 ml H₂O, 5 ml Eisessig (45).

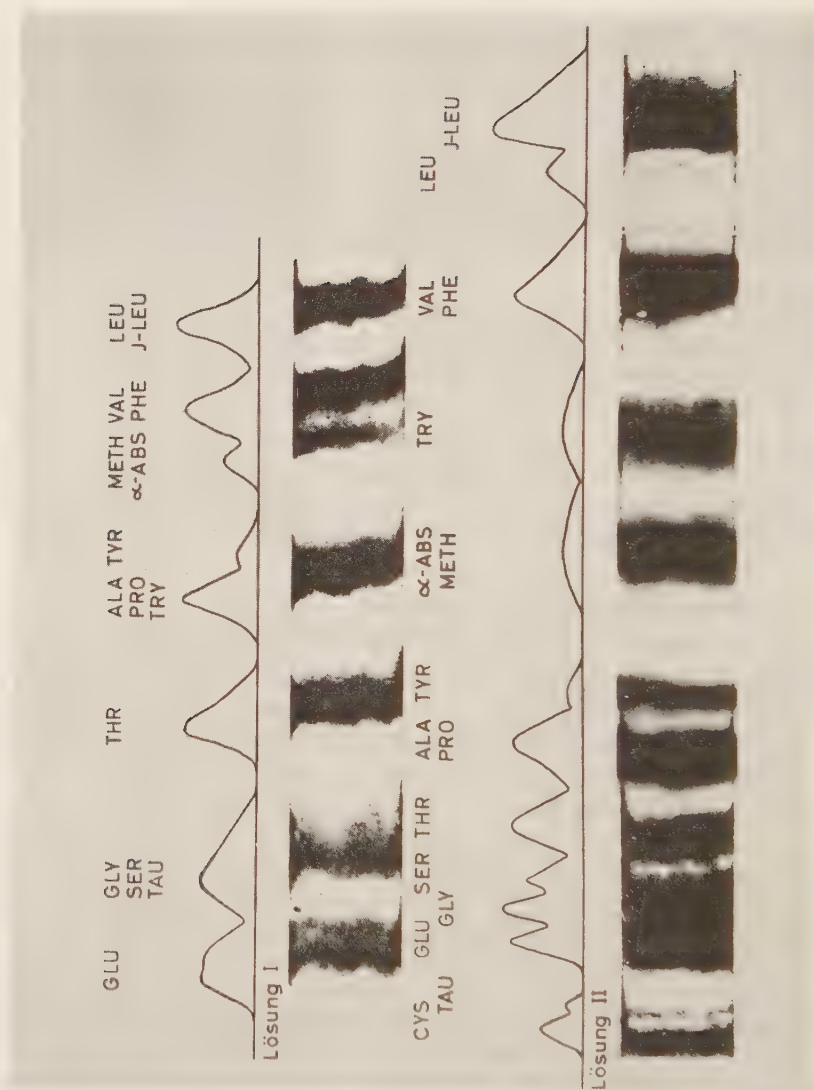
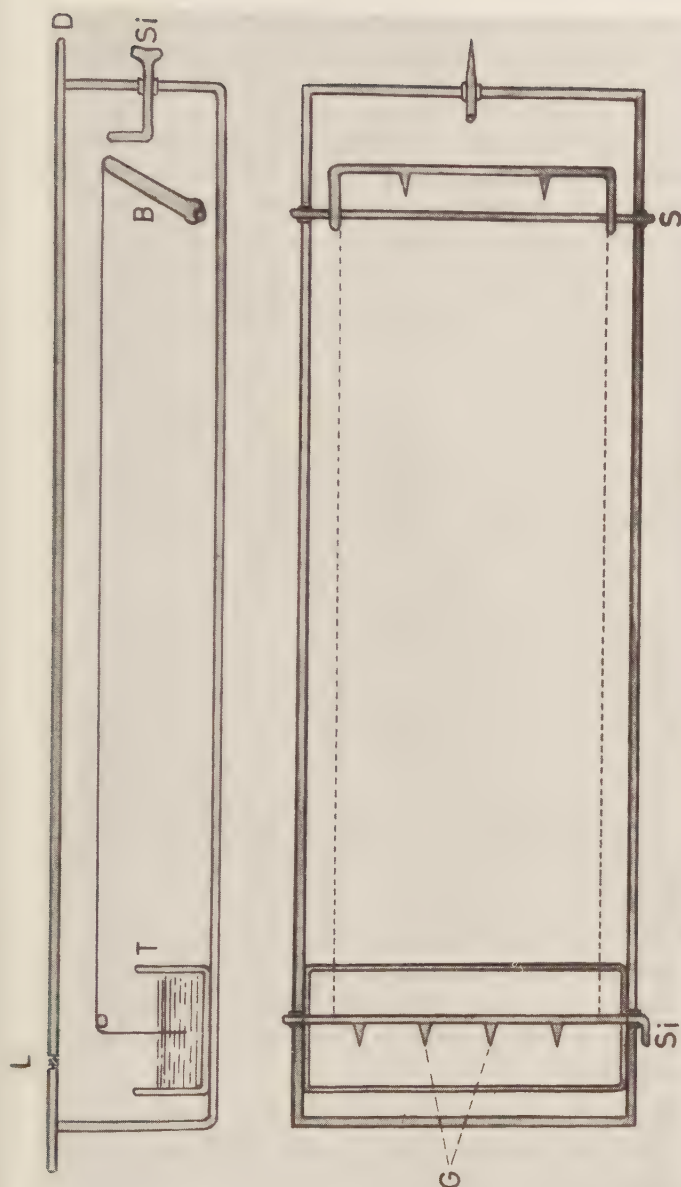


ABBILDUNG 2
Trennung der neutralen Fraktionen

- a) Lösung I: Isopropanol - Eisessig - Wasser (70 : 15 : 15)
b) Lösung II: Isoamylalkohol - n. Butanol - Ameisensäure - Wasser (3 : 4 : 1 : 1)



- D Glasdeckel
- T Trog für Lösung
- B Spannbügel mit 2 Glasdornen (G)
- S₁ Sicherungswinkel
- S₂ Führungsstab für Spannbügel
- L Loch zum Einfüllen von Lösungsmittel

ABBILDUNG 3

Horizontalkammer für eindimensionale horizontale Papierchromatographie, wie sie von uns zur Trennung der neutralen Aminosäuren benutzt wurde (entwickelt von R. Strobel), Hersteller: Bender und Hobein, München.

Dimensionen: Höhe 8 cm, Breite 7 cm, Länge 51 cm.

6. Transparenzöl Bei der photometrischen Auswertung der Chromatogramme verwendeten wir als Transparenzöl ein Gemisch aus Bromnaphthol und Paraffinöl im Verhältnis 1 : 1 (34, 46).
7. Kupferreagenz Um die Farbbänder der Chromatogramme nach der photometrischen Auswertung zu fixieren, tauchten wir sie nach Entfernung des Transparenzöls mittels Äthers in eine Lösung aus 1 ml gesättigter Kupfernitratlösung, 0,02 ml HNO_3 ($\sim 65\%$), 100 ml Aceton (45).
8. Photometrische Auswertung Zur Auswertung der Aminosäurebanden verwendeten wir das direktschreibende Extinktionsgerät Elphor Integrator der Firma Bender und Hobein, München.

b) Technisches Vorgehen

1. Neutrale Aminosäuren Das fertig zugeschnittene Chromatographiepapier wurde auf eine Glasplatte gelegt und mit einem Metalllineal fixiert.

Jede neutrale Fraktion wurde gleichzeitig auf zwei Chromatographiebogen zur Entwicklung in verschiedenen Lösungen aufgetragen. Auf den Streifen I jedes Bogens trugen wir mit einer geeichten Mikropipette 0,03 ml unseres Test-Aminosäuregemisches auf. In die Pipette wurden dazu dreimal 0,01 ml aufgezogen. Beim Auftrag war darauf zu achten, dass die Lösung gleichmässig in einem Strich in Portionen von höchstens 0,005 ml auf das Papier gelangte und sofort durch einen Föhn getrocknet wurde. Auf diese Weise konnten 6 Striche übereinandergelegt werden, ohne dass es zu einem unscharfen Auseinanderfließen an der Startlinie kam. In der gleichen Weise wurden die Streifen II und III jeden Bogens jeweils mit 0,1 ml zweier verschiedener Plasmaextrakte beschickt.

Das Einbringen der Bogen in die entsprechenden Chromatographiekammern hatte mit Hilfe von Pinzetten bzw. fettfreien Gummihandschuhen zu erfolgen. Als Laufmittel wurden die oben angegebenen Lösungen I und II benutzt. Beide Kammern wurden gut verschlossen und in 1 cm dicken, lichtundurchlässigen Isolierkästen aufgestellt.

Nach 20 Stunden hatte das Lösungsmittel den freien Papierrand erreicht. Die Bogen wurden entnommen und getrocknet, die in Laufmittel II entwickelten Bogen gleich anschliessend noch einmal im gleichen Laufmittel entwickelt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist etwas von der Papiersorte abhängig. Dem entsprechend musste die Entwicklungszeit bei Verwendung neuer Papierchargen jeweils neu angepasst werden. Von grosser Wichtigkeit ist die Konstanzhaltung der Temperatur. Der grösste Teil unserer Bestimmungen erfolgte bei $22-25^{\circ}\text{C}$.

Die nach dem zweiten Entwicklungsgang getrockneten Chromatogramme wurden rasch und gleichmässig durch eine frisch hergestellte Ninhydrinlösung (nach Bode) gezogen. Zur Farbentwicklung hängten wir die Papiere bei 100°C für 20 Minuten in den Trockenschrank. Danach zerlegten wir die Bogen in die Einzelstreifen, die aufgerollt in grösseren Petrischalen in Transparenzöl eingelegt wurden. Um alle Luft aus dem Papier zu entfernen und somit eine vollständige und gleichmässige Durchdringung mit Transparenzöl zu erreichen, stellten wir diese 1 Stunde lang lichtgeschützt in einen Vakuumexsikkator. Danach konnten die Chromatogramme mit Hilfe eines Extinktionsmessgerätes photometrisch ausgewertet werden (Abb. 2a und 2b).

Danach lösten wir das Transparenzöl mit Äther aus den Streifen und fixierten die Farbbanden durch rasches Eintauchen in das Kupferreagenz. Die ursprünglich blaue Farbe schlägt bei dieser Behandlung in Rot um.

2. Saure und basische Aminosäuren Die Methode des Auftrags der Fraktionen sowie der entsprechenden Testlösungen war die gleiche wie die bei den neutralen Aminosäuren beschriebene. Der einzige Unterschied bestand in der Auftragsmenge, die bei der sauren und der basischen Fraktion jeweils 0,12 ml des Plasmaextraktes betrug. Zur eindimensional aufsteigenden Chromatographie wurden die fertig beschickten Bogen senkrecht so in die Glastanks gehängt, dass 5 mm des Papiers unten in das Lösungsmittel eintauchten. Die saure Fraktion benötigte zur ausreichenden Auftrennung ihrer Komponenten 24 Stunden. Die basische Fraktion wurde 3 x 24 Stunden chromatographiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde der Bogen erneut getrocknet. Der 3. Entwicklungsgang erfolgte dabei mit der Lösung V. Die weitere Behandlung der Chromatogramme unterschied sich nicht von der der neutralen Fraktion.

Die vom Extinktionsmessgerät geschriebenen Kurven wurden mit dem Präzisionsplanimeter ausgewertet und die Werte der Plasmaextrakte auf die jeweiligen Werte der auf gleichem Bogen mitchromatographierten Testgemische bezogen.

ERGEBNISSE

A . BIOCHEMISCHE BEFUNDE

Folgende Substanzen wurden quantitativ bestimmt: Alanin, α -Aminobuttersäure, Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin, Taurin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin. Dabei konnte für Alanin/Prolin, für α -ABS/Methionin und für Phenylalanin/Valin jeweils nur ein gemeinsamer Wert erhalten werden. Bei den Serien II und III wurde auch für Arginin/Histidin nur ein gemeinsamer Wert ermittelt. Der Gesamtaminostickstoff wurde als Summe der bestimmten Einzelaminosäuren errechnet.

a) Normaltiere (Serie I)

Unsere Normalwerte sind in Tabelle 2 (Spalte 1 und 2) zusammengefasst. Sie stimmen mit den Werten von KNAUFF und WINDSHEIMER ganz gut überein. Kleinere Abweichungen, vor allem bei Glutaminsäure, bei Arginin und bei α -Aminobuttersäure/Methionin, können durch den Unterschied in Tiermaterial und Fütterung, vielleicht auch durch die unterschiedliche Untersuchungsmethodik bedingt sein.

Der Gesamtaminostickstoff war wie bei früheren Untersuchungen wiederum die konstanteste Grösse. Sein Sigmawert ist im Verhältnis zu seinem Absolutwert wesentlich niedriger als bei den Einzelaminosäuren. Die grösste individuelle Schwankungsbreite wurde bei Asparaginsäure, Arginin und Lysin beobachtet. Die Blutspiegel von Cystin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin und Leucin waren dagegen nur geringen individuellen Schwankungen unterworfen. Voruntersuchungen und Parallelversuche mit eingewogenen Testsubstanzen zeigten, dass die mehr oder weniger grosse individuelle Schwankungsbreite der einzelnen Aminosäuren nicht durch Unterschiede in der Genauigkeit, mit der die Substanzen bestimmt werden können, bedingt sind.

b) Mit Thioacetamid behandelte Tiere (Serie II)

Die Aminosäurewerte der mit TAA behandelten Versuchsserie sind in Spalte 3 der Tabelle II wiedergegeben. Der Gesamt α -Aminostickstoff zeigte einen wenn auch geringen Anstieg. Am auffälligsten ist der Anstieg bei Glutaminsäure und Taurin auf über das Doppelte ihres Normalwertes. Auch bei Alanin, Prolin, Threonin und Tyrosin ergibt sich ein signifikanter Anstieg. Dagegen beob-

achteten wir bei Arginin/Histidin, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin/Valin einen signifikanten Abfall. Leider konnten dabei Arginin und Histidin sowie Phenylalanin und Valin nur gemeinsam bestimmt werden. Eine Reihe anderer Aminosäuren zeigte geringere Veränderungen, die jedoch wegen der geringen Zahl der Versuchstiere statistisch nicht zu sichern waren.

c) Mit Thioacetamid und essentiellen Phospholipiden behandelte Tiere (Serie III)

Die Aminosäurewerte dieser Versuchsserie sind in Spalte 4 der Tabelle II zusammengefasst. Der Gesamtaminostickstoff ist hier wieder innerhalb die Schwankungsbreite der Normalwerte abgesunken, wenn er auch noch nicht den normalen Mittelwert erreicht.

Wie Tabelle III zeigt, lassen sich die Aminosäuren, die überhaupt signifikante, Veränderungen in unseren Versuchsserien aufweisen, hinsichtlich ihres Verhaltens bei TAA-Vergiftung mit zusätzlicher EPL-Gabe in 4 Gruppen einteilen.

Gruppe 1: Während Glutamin, Taurin, Threonin und Tyrosin bei alleiniger TAA-Gabe signifikant ansteigen, ergibt sich bei zusätzlicher EPL-Gabe gegenüber diesen Werten ein deutlicher Abfall. Allerdings erreicht dabei lediglich Threonin wieder den normalen Mittelwert, während die Konzentration der drei anderen Substanzen zwar innerhalb der normalen Schwankungsbreite liegen, den Mittelwert der Normaltiere aber nicht erreichen.

Gruppe 2: Die Plasmakonzentrationen von Isoleucin und Serin zeigen gegenüber der TAA-Serie einen Anstieg. Isoleucin liegt nur in der TAA-Serie signifikant unter den Normalwerten. Isoleucin nähert sich bei der TAA-/EPL-Serie immerhin mehr den Normalwerten als bei der TAA-Serie. Während Serin in der TAA-Serie im unteren Bereich der Schwankungsbreite lag, hat sich seine Konzentration in der TAA-/EPL-Serie wiederum dem normalen Mittelwert genähert.

Gruppe 3: Die gemeinsam bestimmten Aminosäuren Phenylalanin/Valin zeigen als einzige Substanzen sowohl in der TAA- als auch in der TAA-/EPL-Serie einen signifikanten Abfall, wobei der in der TAA-/EPL-Serie den bei alleiniger TAA-Gabe sogar übersteigt.

Gruppe 4: Cystin und Lysin bleiben bei der akuten TAA-Vergiftung praktisch unverändert, ergeben aber bei zusätzlicher EPL-Gabe bedeutende Differen-

zen. Die Konzentration für Cystin zeigte in der Serie II gegenüber der Normalserie keine Veränderung, fiel aber in der kombiniert behandelten Serie III auf 50 % des Ausgangswertes ab. Lysin zeigte nur in Serie III signifikanten Anstieg.

B. HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE

Nach 7-tägiger peroraler Zufuhr der hepatotoxischen Substanz Thioacetamid waren in beiden Versuchsserien schwere akute Leberzellveränderungen nachweisbar. Sie fanden sich vorwiegend im Läppchenzentrum und in der Intermediärzone. Neben solitären Leberzellnekrosen fanden sich zahlreiche Kernpyknoten. Weiter kamen in allen betroffenen zentralen und intermediären Läppchenanteilen übergrosse Kernnukleolen vor. Das Cytoplasma zeigte eine ausgeprägte fettfreie Vakuolisierung. Unterschiede zwischen der TAA- und der TAA-/EPL-Serie waren lediglich bei Fettfärbungen erkennbar. 9 von 11 Tieren der TAA-Serie zeigten eine feintropfige diffuse Leberverfettung. In der TAA-/EPL-Serie fanden sich entsprechende Veränderungen nur bei 5 von 13 Tieren und waren weniger deutlich ausgeprägt.

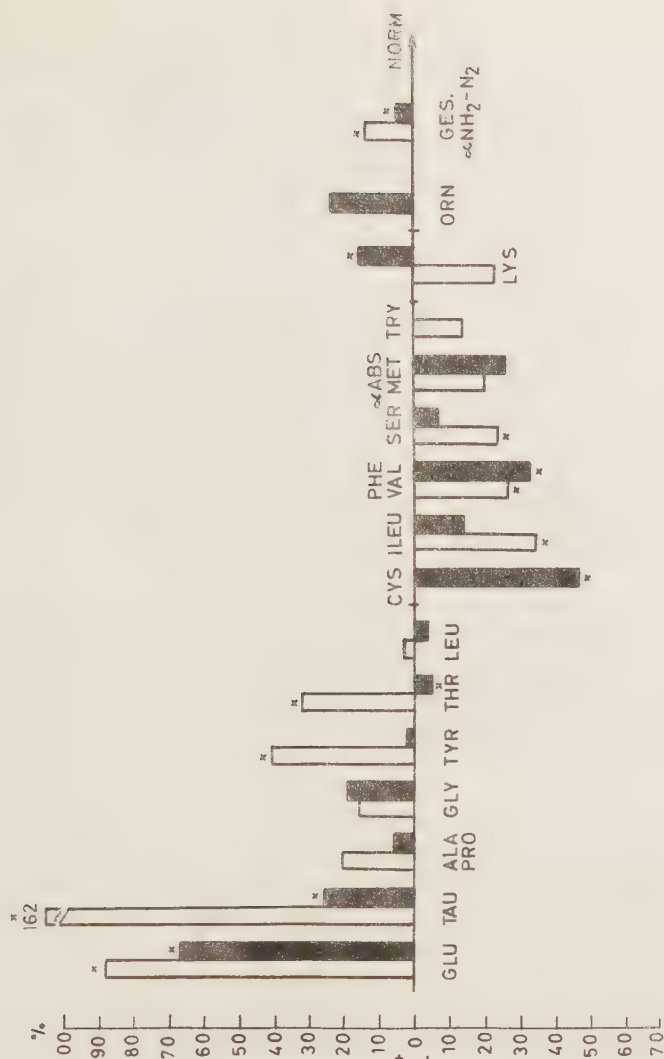


ABBILDUNG 4

Veränderungen der freien Plasma-Aminoäsure-Konzentrationen und des Gesamt- α -Aminostickstoffes bei Vergiftung mit Thioacetamid (weisse Säulen), bei Vergiftung mit Thioacetamid und gleichzeitiger Behandlung mit Phospholipiden (schwarze Säulen), in Prozent zu den Normalwerten ausgedrückt.

+ = Zunahme der Konzentration

- = Abnahme der Konzentration

x = statistisch gesicherte signifikante Veränderung

Amino Acid	Serie I		Serie II		Serie III	
	Normaltiere Mittelwert + σ	Schwankungs- breite	Thioacetamid Mittelwert + σ		Thioacetamid + EPL Mittelwert + σ	
Alanin /Prolin	45,4 $\pm$ 7,5	35,1 - 56,7	54,6 $\pm$ 11,2		48,2 $\pm$ 7,4	
α -ABS Methionin	3,9 $\pm$ 0,8	2,8 - 5,8	4,7 $\pm$ 1,0		4,9 $\pm$ 1,1	
Arginin	7,6 $\pm$ 2,8	4,7 - 12,4				
Histidin	7,9 $\pm$ 0,5	7,1 - 8,5	9,4 $\pm$ 2,9		14,0 $\pm$ 3,3	
Asp.-Säure	2,3 $\pm$ 0,9	1,7 - 3,1	2,4 $\pm$ 0,8		2,3 $\pm$ 0,6	
Cystin	12,9 $\pm$ 1,6	11,1 - 14,4	12,9 $\pm$ 3,3		6,8 $\pm$ 1,6	
Glutamin	33,5 $\pm$ 8,0	21,2 - 45,8	<u>62,9</u> $\pm$ 18,4		<u>53,8</u> $\pm$ 11,5	
Glut.-Säure	3,7 $\pm$ 0,5	2,7 - 4,7	3,5 $\pm$ 0,5		3,5 $\pm$ 0,6	
Glykokoll	25,5 $\pm$ 3,2	19,1 - 29,5	29,8 $\pm$ 5,9		30,6 $\pm$ 7,5	
Isoleucin	9,2 $\pm$ 1,4	7,7 - 11,3	6,0 $\pm$ 1,4		7,9 $\pm$ 1,4	
Leucin	12,0 $\pm$ 1,6	9,4 - 14,3	12,3 $\pm$ 0,9		11,5 $\pm$ 2,5	
Lysin	8,7 $\pm$ 3,0	4,9 - 14,5	6,7 $\pm$ 0,5		<u>10,0</u> $\pm$ 2,3	
Ornithin	2,7 $\pm$ 0,8	1,6 - 3,9	2,7 $\pm$ 0,3		3,4 $\pm$ 1,7	
Phenylalanin/Valin	24,8 $\pm$ 4,5	18,9 - 30,2	<u>18,2</u> $\pm$ 3,7		16,5 $\pm$ 5,2	
Serin	12,4 $\pm$ 3,6	9,4 - 20,2	9,5 $\pm$ 0,4		11,5 $\pm$ 2,7	
Taurin	8,0 $\pm$ 1,9	4,7 - 10,8	<u>20,9</u> $\pm$ 6,5		<u>10,0</u> $\pm$ 3,2	
Threonin	18,1 $\pm$ 3,1	13,6 - 22,8	<u>24,2</u> $\pm$ 5,6		<u>17,3</u> $\pm$ 4,5	
Tryptophan	8,0 $\pm$ 2,2	5,9 - 10,8	6,9 $\pm$ 2,3		8,0 $\pm$ 2,7	
Tyrosin	9,8 $\pm$ 2,0	7,6 - 13,2	<u>13,8</u> $\pm$ 3,9		10,0 $\pm$ 3,6	
Ges. Amino N ₂	31,5 $\pm$ 2,0	28,1 - 34,8	<u>35,9</u> $\pm$ 3,2		<u>33,1</u> $\pm$ 1,7	

TABELLE II

Mittelwert (in $\mu\text{g/ml}$) und Standardabweichung von 21 freien Plasmaamino-säuren, Taurin, und Gesamtaminostickstoff der Normaltiere (Serie I), der mit Thioacetamid (Serie II) sowie der mit Thioacetamid und essentiellen Phospholipiden (Serie III) behandelten Ratten. Bei den Normaltieren ist ausserdem die Schwankungsbreite der Werte angegeben. Die Aminosäuren Alanin/Prolin, α -ABS/Methionin und Phenylalanin/Valin wurden jeweils gemeinsam bestimmt. Alle Werte, die sich signifikant vom Wert der Normaltiere unterscheiden (Zufallswahrscheinlichkeit nach dem t-Test von "Student" 1 : 1000), sind unterstrichen.

	Serie I		Serie II	Serie III	
	Normaltiere Mittelwert + σ in g/ml	Schwankungs- breite g/ml	Thioacetamid Mittelwert + σ g/ml	Thioacetamid + EPL Mittelwert + σ g/ml	
1.	Glutamin	33,5 $\pm$ 8,0	21,2 - 45,8	62,9 $\pm$ 18,4	53,8 $\pm$ 11,5
	Taurin	8,0 $\pm$ 1,9	4,7 - 10,8	20,9 $\pm$ 6,5	10,0 $\pm$ 3,2
	Threonin	18,1 $\pm$ 3,1	13,6 - 22,8	24,2 $\pm$ 5,6	17,3 $\pm$ 4,5
	Tyrosin	9,8 $\pm$ 2,0	7,6 - 13,2	13,8 $\pm$ 3,9	10,0 $\pm$ 3,6
	Ges. Amino N ₂	31,5 $\pm$ 2,0	28,1 - 34,8	35,9 $\pm$ 3,2	33,1 $\pm$ 1,7
2.	Isoleucin	9,2 $\pm$ 1,4	7,7 - 11,3	6,0 $\pm$ 1,4	7,9 $\pm$ 1,4
	Serin	12,4 $\pm$ 3,6	9,4 - 20,2	9,5 $\pm$ 0,4	11,5 $\pm$ 2,7
3.	Phenylalanin Valin	24,8 $\pm$ 4,5	18,9 - 30,2	18,2 $\pm$ 3,7	16,5 $\pm$ 5,2
4.	Cystin-	12,9 $\pm$ 1,6	11,1 - 14,4	12,9 $\pm$ 3,3	6,8 $\pm$ 1,6
	Lysin	8,7 $\pm$ 3,0	4,9 - 14,5	6,7 $\pm$ 0,5	10,0 $\pm$ 2,3

TABELLE III

1. Aminosäuren, deren Konzentration nach Gaben von TAA ansteigt, bei gleichzeitiger Verabreichung von TAA und EPL abnimmt.
2. Aminosäuren, deren Konzentration nach Gaben von TAA abnimmt, bei gleichzeitiger Verabreichung von TAA und EPL ansteigt.
3. Aminosäuren, deren Konzentration sowohl nach Gaben von TAA als auch nach Gaben von TAA und EPL abnimmt.
4. Aminosäuren, deren Konzentration nach Gaben von TAA konstant bleibt, nach Gaben von TAA und EPL abfällt oder ansteigt.

DISKUSSION

A. THIOACETAMID-VERGIFTUNG

Eine den menschlichen Lebererkrankungen, etwa der Virushepatitis, vergleichbare Erkrankung ist beim Versuchstier nicht bekannt. Die experimentelle Leberpathologie ist hier auf die durch hepatotoxische Substanzen erzeugbare Leberschäden angewiesen. Wegen der grossen Unterschiede, die diese untereinander und zu den Leberkrankheiten des Menschen aufweisen, ist jede, nur an einer speziellen Vergiftung gewonnene Aussage in ihrem Wert für die menschliche

Pathologie begrenzt. Erst die Zusammenschau der bei mehreren solchen Schäden durch Gifte mit verschiedenem Angriffspunkt erhobenen Befunde bietet vielleicht die Möglichkeit zu prinzipielleren Aussagen. Während KNAUFF und WINDSHEIMER das Aminosäurespektrum in Parallelität zu den histologischen Veränderungen bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung untersucht haben, befasst sich die vorliegende Arbeit mit den Veränderungen bei der Thioacetamidvergiftung.

Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen am Leberparenchym bei der Thioacetamidvergiftung bestehen vor allem in einer Grössenzunahme der Leberzellkerne und ihrer Nucleolen sowie einer vacuoligen Aufhellung des Cytoplasmas (47-50). Als Ursache nimmt man an, dass die Ausschleussung der im Kern gebildeten Ribonuceoproteide ins Cytoplasma stark eingeschränkt oder völlig blockiert ist (47, 51, 52). Die auffallende Grössenzunahme von Kern und Nucleolen würde dadurch erklärt. Auch die Aufhellung und Vacuolisierung des Cytoplasmas, die zunächst als Ausdruck einer gestörten Zellatmung gedeutet werden könnten (53, 54), ist besser als Verarmung an im Zellkern gebildeten Nucleoproteiden und Folge eines cytoplasmatischen Kompensationsversuchs zu erklären (47). Dadurch wird der Aufbau der Ergastoplasmalamellen beeinträchtigt, die sich im aufgehellten Cytoplasma zu eigenartigen Wirbelbildungen zusammenlagern (47, 24).

Trotz dieser Kenntnisse ist der genaue Wirkungsmechanismus nicht völlig gesichert und insbesondere der primäre Angriffspunkt des Thioacetamid am Kern der Leberzellen noch unklar. Der histologische Befund der akuten Thioacetamidvergiftung ähnelt etwas dem der Hepatitis (22, 21).

Das Gewebsbild der Leber stimmte in den vorliegenden Untersuchungen etwa mit den histologischen Schäden überein, die von SACHS und Mitarbeitern sowie von GEORGII, MEHNERT und Mitarbeitern beschrieben wurde. Die von ALTMANN näher beschriebenen Protoplasmalamellen liessen sich dagegen nicht nachweisen. Unterschiede zu den Angaben anderer Autoren (19, 55, 56) dürften damit zusammenhängen, dass etwas kleinere Giftmengen verwendet und das Gift mit der Schlundsonde zugeführt wurde.

Das Spektrum der freien Plasmaamino-säuren zeigte bei der akuten Leberschädigung durch Thioacetamid ausgeprägte Verschiebungen. Eine strenge Parallelität zur Schwere des histologischen Befundes fehlte dabei jedoch. Die biochemischen Abweichungen sind im ganzen bei der Leberschädigung durch Thioacetamid etwas geringer ausgeprägt als bei der von KNAUFF und WINDSHEIMER mit vergleichbarer Methodik untersuchten auch histologisch eindrucksvollen Tetrachlorkohlenstoffvergiftung (18).

Am bemerkenswertesten ist das Verhalten des Gesamt- α -Aminostickstoffs. Nach 7-tägiger peroraler Giftzufuhr liegt der Mittelwert um weniger als 15 % über dem Normalwert. Die meisten Einzelamino-säuren zeigen dagegen eine wesentlich

geringere Abweichung. Auch bei der experimentellen Leberschädigung hatte sich gezeigt (18), dass der Gesamt- α -Aminostickstoff von allen untersuchten Grössen am strengsten reguliert wird. Der Organismus scheint also die Regulation des Gesamtaminostickstoffs auch unter pathologischen Bedingungen möglichst lange aufrechtzuerhalten.

Wie bei der akuten CCl_4 -Vergiftung (24 Stunden) zeigt auch bei den mit Thioacetamid behandelten Tieren das Glutamin den grössten Anstieg. Seine Konzentration war gegenüber dem Normalwert fast verdoppelt ($62 \mu\text{g/ml}$, normaler Mittelwert $33,45 \mu\text{g/ml}$). Bekanntlich nimmt Glutamin an verschiedensten Prozessen des intermediären Stoffwechsels teil. Durch Konjugation ist es an zahlreichen Entgiftungsprozessen beteiligt (57, 58, 59). Bei der Purin-Synthese (60-63), der Bildung von Aminosuktern (64), der Harnstoffbildung (65), im Krebs-Henseleit'schen Ornithin-Zyklus (66, 67, 68) wirkt es mit. Durch Glutamintransaminase II ist es an Transaminierungsreaktionen (69, 70) und durch Vermittlung der Glutaminase an der Glutaminsäurebildung (71) beteiligt. Ausserdem wird heute angenommen, dass das Glutamin-Glutaminsäure-System einen regulierenden Einfluss hat auf die Metaboliten, die in den Zitronensäure-Zyklus eintreten (70, 72). Infolge dieser mannigfaltigen Beziehungen des Glutamins im intermediären Stoffwechsel ist die grosse Zunahme dieser Substanz bei der Thioacetamid-Vergiftung nicht eindeutig zu interpretieren.

Wegen der engen metabolischen Verknüpfungen von Glutamin und Glutaminsäure wurde man eventuell eine Konzentrationsänderung auch der Säure erwarten. Überraschenderweise ist das aber nicht der Fall. Die freie Glutaminsäure bleibt auch nach Vergiftung mit TAA bemerkenswert konstant.

Auch Prolin und Ornithin sind reversibel mit Glutaminsäure verknüpft (73). Histidin kann durch Vermittlung von Histidinase in Glutaminsäure übergehen (74, 75). Bei der TAA-Vergiftung bleibt der Ornithinwert ebenfalls sehr konstant. Das Verhalten der anderen Substanzen kann aus methodischen Gründen bisher nicht sicher beurteilt werden. Histidin und Arginin wurden nur bei der Normalserie einzeln bestimmt. Bei der thioacetamid-behandelten Serie aber misslang die saubere Trennung beider Substanzen. Der Vergleich der Summe zweier Einzelwerte einer Serie mit dem gemeinsamen Wert einer anderen Serie ist, wie Vorversuche mit eingewogenen Reinsubstanzen ergaben, mit zu grossen Unsicherheitsfaktoren belastet, als dass hier sichere Aussagen möglich wären. Prolin wurde mit Alanin zusammen bestimmt. Eine individuelle Veränderung allein dieser Aminosäuren ist daher ebenfalls nicht feststellbar.

Bekanntlich sind bestimmte Aminosäuren an der Harnstoffsynthese in der Leber beteiligt (66). Von den von uns gemessenen Substanzen sind Arginin, Ornithin und Asparaginsäure Glieder dieser Reaktionskette (66). Weder Ornithin

noch Asparaginsäure zeigen bei der akuten TAA-Vergiftung Veränderungen. Arginin ist, wie vorher erwähnt, schwierig zu beurteilen. Während bei anderen experimentellen Leberschädigungen der Ablauf des Harnstoffzyklus beeinträchtigt scheint (18), sind bei der akuten TAA-Schädigung die konstanten Werte der Zyklusteilnehmer auffallend. Hier könnte nur die grosse Zunahme von Glutamin auf eine vermutliche Hemmung dieser Vorgänge hinweisen.

Die schwefelhaltigen Substanzen, die gemessen wurden, sind Cystin, Taurin und Methionin. Methionin wurde dabei zusammen mit α -ABS bestimmt. Der gemeinsame Wert zeigte eine geringe, nicht signifikante Abnahme. Einen signifikanten Anstieg weist Taurin auf. Taurin leitet sich durch Decarboxylierung über Cysteinsulfinsäure und Cysteinsäure vom Cystin-Cystein ab (76, 77, 78, 80, 84). Die Cystin-Werte bei der Thioacetamid-Serie liegen alle noch innerhalb der normalen Schwankungsbreite. Da Taurin im Körper nur durch diese Reaktionen entsteht (78, 80), ist die Anhäufung dieses Metaboliten sehr merkwürdig. Die Ausscheidung des Taurins erfolgt nur zum Teil direkt in den Harn (79), zum Teil erfolgt sie nach Kopplung an Gallensäure als Taurocholsäure, als Thiotauren (81) in die Galle (82). Ein weiterer Teil wird zu Isäthionsäure (105, 106) oxydiert. Die folgenden Deutungen der Taurin-Anhäufung sind möglich: entweder sind die Wege des Cystinabbaus blockiert, die durch oxydative Desaminierung und gleichzeitige Transaminierung zu Sulfinylbrenztraubensäure oder mittels Desulphydrasen zu Aminoacrylsäure und damit zu Alanin führen (80, 83), so dass ein weit grösserer Teil des Cystinabbaus über Taurin erfolgt, oder aber die Umwandlung von Taurin in Taurocholsäure (82) oder in Isäthionsäure ist mangelhaft. Da die Leber sowohl beim Cystinabbau als auch im Taurinstoffwechsel eine hervorragende Rolle spielt (82), ist eine Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten allein aus den vorliegenden Ergebnissen heraus nicht zu treffen.

Auch Tyrosin stieg bei den vergifteten Tieren an. Phenylalanin, das irreversibel in Tyrosin umgewandelt wird (85, 86), wurde mit Valin zusammen bestimmt, so dass die Deutung des Tyrosinanstiegs sowie der Beziehungen zwischen Tyrosin und Phenylalanin begrenzt ist.

Die beiden Aminosäuren Threonin und Serin, die im Körper in Glykokoll übergehen können (87, 88), verhalten sich bei der Thioacetamidvergiftung entgegengesetzt. Während Threonin signifikant zunimmt, zeigt Serin eine signifikante Abnahme. Glykokoll lässt dagegen keine statistisch gesicherte Konzentrationsänderung erkennen. Da die Rolle von Serin und Threonin im intermediären Stoffwechsel noch nicht völlig geklärt ist und Glykokoll keine Abweichungen zeigt, muss das merkwürdig gegensätzliche Verhalten dieser Stoffe nur Beobachtung bleiben.

Einen signifikanten Konzentrationsabfall zeigte noch Isoleucin, der Wert von Leucin blieb dagegen konstant.

B. THIOACETAMID-VERGIFTUNG UNTER GLEICHZEITIGER BEHANDLUNG MIT PHOSPHOLIPIDEN

In der neueren Literatur wurde mehrfach darauf hingewiesen, dass gewisse aus Sojabohnen gewinnbare Cholinphospholipide beim Menschen eine Leberschutzwirkung entfalten (89, 90, 91, 92, 93). Diese Substanzen zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vorwiegend Linolsäure, aus und scheinen in vielen Reaktionen des intermediären Stoffwechsels einzugreifen (94). SCHETTLER fand bei verschiedensten Leberaffektionen des Menschen sowie bei experimentellen toxischen Leberschäden eine zum Teil hochgradige Vermehrung der Neutralfette, des Cholesterins und der Cholesterinester in Leber und Blutplasma, während die Phospholipide dort eher vermindert waren (92). Durch therapeutische Zufuhr von Phospholipiden, die nach Isotopenversuchen rasch in die Leber gelangen (95), lässt sich dies verhindern (96, 97). Einmal wird durch diese Stoffe wahrscheinlich die Fettsäureoxydation gesteigert. Zum anderen wird der Abtransport der Neutralfette aus der Leber und ihre weitere Verwertung gefördert und dadurch insbesondere die Ausbildung einer Fettleber hintangehalten (90, 92, 93, 98). Auch andere Leberaffektionen und toxische Schäden sollen durch Zufuhr der genannten Phospholipide günstig beeinflusst werden (89, 90, 96, 97, 99, 100). Über den pharmakodynamischen Wirkungsmechanismus dieser jetzt auch als gereinigte Fraktion mit besonders hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren zur Verfügung stehenden Substanzen ist bisher aber noch wenig bekannt.

Wie oben gezeigt, führt die Thioacetamid-Vergiftung zu schweren histologisch nachweisbaren Leberschäden, die erhebliche Veränderungen im Spektrum der freien Plasmaamino-säuren mit sich bringen. Es lag daher nahe, zu prüfen, ob sich diese histologischen Leberschäden oder ihre Auswirkung auf die Plasmaamino-säuren durch therapeutische Phospholipidgaben beeinflussen lassen.

Im Tierexperiment (101) führte eine 4 Wochen dauernde alleinige Zufuhr sehr grosser Phospholipidmengen, die dem 50-fachen der üblichen therapeutischen Dosis beim Menschen entsprechen, zu keinerlei degenerativen Schäden an der Leber. Bei einem Teil der Tiere fanden sich dagegen feintropfige Lipoid-einlagerungen im Protoplasma der Leberzellen. Die oben beschriebenen histologischen Veränderungen nach Vergiftung mit Thioacetamid konnten durch gleichzeitige Phospholipidbehandlung nicht verhindert werden. Ihre Ausbildung wurde auch nicht verzögert oder abgeschwächt. Lediglich die diffuse, feintropfige Leberzellverfettung, die nach 7-tägiger peroraler TAA-Zufuhr beobachtet werden konnte, ist bei gleichzeitiger Phospholipidgabe wesentlich geringer ausgeprägt. Obwohl die lipotrope Wirkung von Cholinphospholipiden seit langem bekannt ist (92, 96), ist dieser Befund nach den oben zitierten Beobachtungen

von KNAUFF, GEORGII und MATZEN zunächst überraschend. Die Annahme ist berechtigt, dass sich die dort beobachteten Lipide trotz der Ähnlichkeit im histologischen Bild biochemisch von jenen unterscheiden, die nach Thioacetamid-Verabreichung in den Leberzellen nachweisbar sind. Pathologisch gespeicherte Fettstoffe könnten durch Zufuhr von Phospholipiden wieder mobilisiert werden, obwohl diese oder einzelne ihrer Bestandteile ebenfalls zeitweilig in der Leber gespeichert werden, wenn sie allein in grossen Mengen zugeführt aber nicht benötigt werden. Auch die Möglichkeit, dass sie unter diesen Bedingungen die Synthese von Fetten oder bestimmten Lipiden in der Leberzelle stimulieren, wäre zu diskutieren. SCHÖN (98) berichtet z. B. über eine Stimulierung der Cholesterinsynthese nach Belastung mit hoch ungesättigten pflanzlichen Ölen. Diese Fragen können jedoch nur durch chemische oder histochemische Analyse der deponierten Lipide oder der an den Umsetzungen beteiligten Fermente näher geklärt werden. Der histologische Schnitt allein gibt darüber keine Auskunft.

Über den Einfluss therapeutischer Gaben von Phospholipiden auf das Spektrum der freien Plasmaamino-säuren war bisher nichts bekannt. Bei gesunden Ratten bewirkte, wie KNAUFF, GEORGII und MATZEN gezeigt haben, eine Behandlung mit hohen Dosen dieser Stoffe keine wesentliche Veränderung des Aminospektrums. Phenylalanin, Glykokoll und Leucin waren zwar geringgradig vermindert, im ganzen scheint der intermediäre Aminosäurestoffwechsel jedoch nicht beeinträchtigt zu werden.

Dagegen lagen bei den kombiniert mit TAA und Phospholipiden behandelten Ratten die Konzentrationen fast aller wichtigen Aminosäuren näher am Normalbereich als bei entsprechenden, lediglich mit TAA behandelten Tieren, unabhängig davon, ob sie dort vermehrt oder vermindert waren. Das gilt insbesondere für Glutamin, Taurin, Alanin/Prolin, Tyrosin, Isoleucin, Serin und Tryptophan. Auch der Mittelwert des Gesamt- α -Aminostickstoffes lag bei den kombiniert behandelten Tieren näher am Normwert als bei nur mit TAA vergifteten Ratten. Die für die TAA-Vergiftung charakteristischen Verschiebungen im Aminosäurespektrum waren also insgesamt wesentlich geringer ausgeprägt. Nur wenige Substanzen bildeten hier eine Ausnahme. Zum Beispiel Glycin, Valin/Phenylalanin, Cystin und α -ABS-Methionine, die bei kombinierter Behandlung etwas stärker oder in anderer Richtung verändert sind als ohne Phospholipidgabe. So zeigt Cystin lediglich bei kombiniert behandelten Tieren einen signifikanten Abfall auf 34 % seines Normalwertes. Taurin nähert sich dagegen den Normalwerten. Der Stoffwechsel des organisch gebundenen Schwefels lässt sich durch Behandlung mit EPL also deutlich beeinflussen. Bei Threonin steht einem signifikanten Anstieg in der TAA-Serie ein signifikanter Abfall in der kombiniert behandelten Serie gegenüber. Jedoch ist die relative Veränderung bei gleichzeitiger EPL-Gabe geringer. Lysin zeigt im intermediären Stoffwechsel eine merkwürdige Stabilität (102, 103). Seine α -Aminogruppe ist an Transaminierungen und Desami-

nierungsvorgängen nicht beteiligt (104). Auch bei der Thioacetamid-Vergiftung sind die Lysinänderungen nicht signifikant. Es ist daher interessant zu vermerken, dass diese sonst sehr stabile Aminosäure bei Phospholipidgaben eine signifikante quantitative Veränderung aufweist.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei 20 mit dem Lebergift Thioacetamid behandelten und nach 7 Tagen getöteten Ratten wurden 21 freie Plasmaamino-säuren sowie Taurin mit Hilfe eines genauen papierchromatographischen Verfahrens quantitativ bestimmt. 10 unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. 52 weitere Tiere wurden für methodische Vorversuche benötigt. Die Lebern wurden histologisch untersucht.
2. Die Thioacetamid-Vergiftung führte zu den bekannten toxisch bedingten hepatitis-ähnlichen Schäden an der Leber. Das Spektrum der freien Plasmaamino-säuren und Taurin zeigten bei diesen Tieren erhebliche Veränderungen. Die Regulation des Gesamt- α -Aminostickstoffs im Plasma scheint nach Thioacetamid-Vergiftung gewährleistet. Auch der Spiegel von Cystin, Ornithin, Glycin, Tryptophan, Leucin und Lysin ist nicht verändert.

Die Konzentration von Glutamin, Taurin, Tyrosin, Threonin, Isoleucin und Serin weicht dagegen mehr oder weniger stark von der Norm ab.

3. 20 Ratten wurden mit dem Lebergift und zusätzlich mit einer linolsäurereichen Cholinphospholipid-Fraktion aus Sojabohnen (EPL-Substanz), der eine gewisse Leberschutzwirkung nachgesagt wird, behandelt und nach 7 Tagen getötet. Bei sämtlichen Versuchstieren wurden, ebenso wie bei der TAA-Vergiftung, die 21 freien Plasmaamino-säuren und Taurin quantitativ bestimmt, und die Lebern histologisch untersucht.
4. Die bekannten, histologisch nachweisbaren Schäden an der Leber durch Thioacetamid konnten durch zusätzliche Behandlung mit Phospholipiden nicht beeinflusst werden. Lediglich die bei TAA-Vergiftung auftretende feintropfige Leberzellverfettung wurde verhindert. Dagegen liegen bei den kombiniert mit TAA und EPL behandelten Ratten die Konzentrationen aller Aminosäuren, mit Ausnahme von Cystin, Phenylalanin/Valin und Ornithin, näher am Normalbereich als bei entsprechenden lediglich mit TAA behandelten Tieren. Die beobachteten Verschiebungen im Aminosäurespektrum waren daher bei kombinierter Behandlung im allgemeinen wesentlich geringer als bei der TAA-Vergiftung. Die Deutung dieser Befunde ist schwierig, da über die Beziehungen der Phosphatide zum Aminosäure- und Eiweiss-Stoffwechsel noch zu wenig bekannt ist.

Am Schluss meiner Arbeit erlaube ich mir Herrn Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel für die Genehmigung in seinem Labor in der II. Med. Klinik arbeiten zu dürfen, sowie für die Überlassung des erforderlichen Materials, meinen verbindlichen Dank auszusprechen.

Herrn Priv. -Doz. Dr. H. -G. Knauff danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Weicker, B. Über den Nachweis gestörter Teilfunktionen als Grundlage funktioneller Leberdiagnostik, *Zschr.f.d.ges.exper.Med.* (1932), 81, Seite 481
2. Kirk, E. Amino acid and ammonia metabolism in Liver Diseases. *Acta med.Scand.* (1936) supp.77
3. Lytte, J.D.; Goetsch, E.; Greely, D.M.; Grim, W.M. und Dunbar, P. Amino acid studies II. Plasma amino acid retention as evidence of impaired Liver function. Investigations in Children with Nephrosis and Liver Disease. *Journal of clinical Investigation* (1943), 22, 169
4. Bollmann, J.L.; Mann, F.C. und Magath, T.B.
Studies on the Physiology of the Liver. XV.Effect of total Removal of the Liver Deamination. *American Journal of Physiology*, (1926), 78, S.258
5. Bollman, J.L.; Mann, F.C. und Magath, T.B.
Studies on the Physiology of the Liver. VIII.Effect of total Removal of the Liver on the Formation of Urea. *American Journal of Physiology*, (1924), 69, Seite 371
6. Mann, F.C. The Effect of complete and partial Removal of the Liver. *Medicine (Baltimore)*, (1927), 6, Seite 419
7. Bickel, H. und Souchon, F.
Die Papierchromatographie in der Kinderheilkunde. *Arch. Kinderheilkunde.* 31, Beiheft (1955)
8. Cachin, M.; Durlach, J. und Blass, J.
Les acides aminés du serum sanguin en pathologie hépatique *Semamne Hop.* (1952) 3231.
9. Dent, C.E. Der Aminosäurestoffwechsel. *Schweiz.med.Wochenschr.* (1950) 80, Seite 752
10. Hsia, D.Y. und Gellis, S.S.
Amino acid metabolism in infectious Hepatitis. *Journal of clinical Investigation.* (1957) 36, S.706
11. Iber, F.L.; Rosen, N.; Levenson, S.M. und Chalmers, T.C.
The Plasma Amino acids in patients with Liver failure. *Journal of Laboratory and clinical Medicine.* (1957) 50, S.417

12. Müting, D. Der Aminosäurehaushalt des Menschen. Arzneimittelforschung. (1955) 8. Beiheft
13. Schreier, K. und Sattelberg, H.
Untersuchungen über den Aminostoffwechsel bei Erkrankungen der Leber. Deutsche med. Wochenschrift (1951) 76, S. 866
14. Vries, de A. und Alexander, B.
Studies on Amino acid metabolism. II. Blood glycine and total Amino acids in various pathological Conditions with Observations on the Effects of intravenously administered Glycine. Journal of clin. Investigation (1948) 27, S. 655
15. Walsche, J.M.
Disturbances of Amino acid metabolism following Liver Injury. Quarterly Journal of Medicine (1953) 88, Seite 483
16. Walsche, J.M. und Senior B.
Disturbances of Cystin metabolism in Liver disease. Journal of clin. Investigation (1955) 34, Seite 302
17. Wewalka, F. Beziehungen zwischen Störungen des Aminosäurestoffwechsels und Leberkrankheiten. Acta Hepatologica (1956) 4, S. 137
18. Knauff, H.G. und Windsheimer, F.
Das Verhalten von Gesamtaminostickstoff und 21 freien Plasmaamino-säuren bei der experimentellen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff. Naunyn-Schmiedberg's Arch. Exp. Path. und Pharmak. (1960) 239, Seite 442
19. Brodehl, J. Thioacetamid in der experimentellen Leberforschung. Klinische Wochenschrift, (1961) 39, Seite 956
20. Sachs, M.W.; Bäumer, A. und Menkhau, G.
Histochemische Untersuchungen zur Giftwirkung des Thioacetamids auf die Rattenleber. Acta hepatosplenol (Stuttgart). (1959) 6, Seite 286
21. Schaetz, G. Experimentelle Leberzirrhose mit Thioacetamid. Deutsche med. Wochenschrift (1957) 82, Seite 2082
22. Eger, W.; Schulz, E und Stratakis, K.
Die durch Allylalkohol oder Thioacetamid experimentell erzeugte Leberzirrhose unter dem Einfluss von Prednisolon. Med. Welt (1951) 28 I, Seite 871

23. Schweitzer, C.H. und Schätz, G.
Die Erzeugung experimenteller Leberzirrhose durch Thioacetamid. 4. Symposium über Leberkrankheiten der Med. Universitäts-Klinik Freiburg, 1956, S.163
24. Thoenes, W. und Banasch, P.
Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Cytoplasma der Leberzellen nach akuter und chronischer Thioacetamid-Vergiftung. Virchows Arch.Path. Anat. (1962) 335, Seite 556
25. Jacyszyn, K. und Szymanski, R.
Phospholipide in der Therapie der chronischen Glomerulonephritis mit nephrotischem Syndrom. Med.Monatsschrift (1961) 15, Seite 819
26. Gregl, A. Leberschutztherapie in der Bekämpfung des Strahlensyndroms. Ärztliche Praxis (1958) 10, Seite 749
27. Dornbusch, S. und Zielke, A.
Die Beeinflussung der tierexperimentellen Arteriosklerose durch "essentielle" Phospholipide. Med.Welt (1960) 33, S.1685
28. Kautzsch, E. Beurteilung und Behandlung der Leberverfettung. Med.Monatsschrift (1962) 16, Seite 242
29. Kautzsch, E. Akute Leberkrankheiten. Therapie-Woche (1961) 11, S.420
30. Kautzsch, E. Leberschäden bei chronisch unterschwelliger Hypoxie. Therapeutische Umschau (1961) 18, Seite 139
31. Llinares, M.V.
Diagnostische und therapeutische Bedeutung des Lipid-Stoffwechsels. Ärztliche Praxis (1961) 13, Seite 2281
32. Airo, R.; Gianelli, G.; Ebbli, D. und Grandini, U.
Phospholipide in der Behandlung von Leberleiden. Medizin heute (1961) 10, Seite 16
33. Knauff, H.G. und Böck
Über die freien Gehirnaminosäuren und das Athenolamin der normalen Ratte und das Verhalten dieser Stoffe während der experimentellen Insulinhypoglykämie. J.Neurochem. (1961) 6, Seite 171

34. Knauff, H.G.; Dieterle, P. und Zickgraf, H.
Quantitative Bestimmung von 21 freien Plasmaamino­säuren bei gesunden Versuchspersonen. Hoppe Seylers Zschr. für physiol.Chem. (1955) 316, Seite 186
35. Grassmann, W.; Hannig, K. und Plöckl
Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Eiweißhydrolysaten durch Kombination von Elektrophorese und Chromatographie. Hoppe-Seylers Zschr. für physiol.Chem. (1955) 299, Seite 258
36. Grassmann, W. Über ein Verfahren zur Stofftrennung durch Kataphorese, Vortrag Tagung der Physiologen und physiol.Chemiker, Göttingen, 3.8.1948, Ber.Physiol. (1950) 139, Seite 220
Angew.Chem. (1950) 62, Seite 170
37. Grassmann, W. und Hannig, K.
Ein einfaches Verfahren zur kontinuierlichen Trennung von Stoffgemischen auf Filterpapier durch Elektrophorese. Natur. Wiss. (1950) 37, Seite 397
38. Grassmann, W.
Neue Verfahren der Elektrophorese auf dem Eiweißgebiet. Natur.Wiss. (1951) 38, Seite 200
39. Grassmann, W. und Hübner, L.
Chromatographische und elektrophoretische Analysefarbstoffe. Leder Nr.5, Seite 4 (1954)
40. Grassmann, W. und Hannig, K.
Trennung von Stoffgemischen auf Filterpapier durch Ablenkung in elektrischem Feld. Hoppe.Seylers Ztschr. für physiol. Chem. (1953) 292, Seite 32
41. Grassmann, W. und Hannig, K.
Elektrophoretische Untersuchungen an Schlangen und Insecten-Toxinen. Hoppe-Seylers Zschr. für physiol.Chem. (1954) 296, Seite 30-44
42. Michl, H. Über Papierionophorese bei Spannungs­gefällen von 50 Volt/cm. Monatshefte für Chemie (1951) S.489
43. Windsheimer, F.
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1961), Das Verhalten von Gesamt-Aminostickstoff und 21 freien Plasmaamino­säuren bei der experimentellen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff.

44. Strobel, R. Inaural-Dissertation naturwissenschaftl. Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1957), Zur Konstitution des Insulins und chromatographische methodische Entwicklung.
45. Bode, F. Eine Vereinfachung und Verbesserung der Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden mittels des Ninhydrin-Kupfer-Komplexes. Biochem.Z. (1955) Band 326, Seite 433
46. Knauff, H.G.; Meyer, G. und Marx, D.
Über die Aminosäurezusammensetzung der Gehirnproteine. Hoppe.Seylers Zschr. für physiol.Chem. (1961) 326, S. 78
47. Altmann, H.W. und U.Osterland
Über cytoplasmatische Wirbelbildungen in den Leberzellen der Ratte bei chronischer Thioacetamid-Vergiftung. Beitrage Path.Anat. (1961), 124, I
48. Georgii, A. und Mehnert, H.
Über Leberveränderungen durch Thioacetamid bei gleichzeitiger Belastung mit blutzuckersenkenden Substanzen der Biguanidin-Reihe. Beitr. Path.Anat. (1961) 124, Seite 278
49. Laird, A.K. Nuclear changes induced in rat liver cells by Thioacetamide. Arch.Biochem.Biophys. (1953) 46, Seite 119
50. Rather, J. Experimental alteration of nuclear and cytoplasmic components of the liver cell with Thioacetamide I. Early onset and reversibility of volume changes of the nucleolus nucleolus and cytoplasm. Bull.Johns Hopkins Hospital (1951) 88, Seite 36
51. Georgii, A.; Mehnert, H.; Prosiegel, R.; Kasten, H. und Stock, G.
Tierexperimentelle Leberbefunde nach langfristigen Sulfonharnstoffgaben (D 860) und gleichzeitiger Leberschädigung mit Thioacetamid. Z.exp.Med. (1959) 131,Seite 181
52. Kleinfeld, H.G.
Early changes in rat liver and kidney cells induced by Thioacetamide. Cancer. Res. (1957) 17, Seite 594
53. Becker, V. und Neubert, D.
Über die Entstehung der hydroptisch vacuolären Zellentartung. Beitr. Path.Anat. (1958) 120, S.319

54. Knauff, H.G. und Schramm, W.
Zur Frage morphologischer Äquivalenzbilder der histotoxischen Hypoxydose. Frankfurt 2.Path. (1956) 67, Seite 308
55. Gupta, D.N. Production of Cancer of the Bile-ducts with Thioacetamide. Nature (1955) 175, Seite 257
56. Fiume, L. Topographic Distribution of Hepatic Nekrosis in Bromobenzene, Thioacetamide, Tannic acid poisoning and Inhibition by amino aceto nitride of the Necrosis induced by Bromobenzene. Nature (1963) 197, S.394
57. Thierfelder und Scherwin
Phenyl-Acetyl-Glutamin ein Stoffwechselprodukt des menschlichen Körpers nach Eingabe von Ψ -Essigsäure. Berichte der Deutsch.Chem.Ges. (1914) 47, S.2630
58. Scherwin, C.P.
Comparative metabolism of certain aromatic acids. J.biol. chem. (1917) 31, Seite 307
59. Scherwin, C.P.; Wolf, M. und Wolf, W.
The maximum production of glutamine by the human body as measured by the output of phenylacetyl glutamine. J. biol. Chem. (1919) 37, Seite 113
60. Leuenberg, B. und Buchanan, J.M.
Biosynthesis of the Purines. XII. Structure, enzymatic Synthesis and metabolism of 5-aminoimidazole Ribotide. J. biol. Chem. (1957) 224, Seite 1005
61. Leuenberg, B. und Buchanan, J.M.
Biosynthesis of the Purines. XIII. Structure, enzymatic Synthesis, and metabolism of (α -N-Formyl)-Glycinamide Ribotide. J. biol. Chem. (1957) 224, Seite 1019
62. Melnick, I. und Buchanan, J.M.
Biosynthesis of the purines. XIV. conversion of (α -N-Formyl)-Glycinamide Ribotide to (α -N-Formyl)-Glycinamidine Ribotide, Purification and Requirements of the enzyme system. J. biol. Chem. (1957) 225, Seite 157
63. Sonne, J.C.; Lin, I. und Buchanan, J.M.
Bioxynthesis of the Purines. IX. Precursors of the Nitrogen atoms of the Purine Ring. J. biol. Chem. (1956) 220, S. 369

64. Pogell, B.M. und Gryder, R.M.
Enzymatic Synthesis of Glucosamine-6-Phosphate in Rat Liver. (1956) J.biol.Chem. 228, Seite 701
65. Leuthardt, F. Untersuchungen über die Harnstoffbildung aus Glutamin.
Hoppe-Seylers Zschr. für physiol.Chem. (1938) 252, S.238
66. Krebs-Henseleit
Untersuchungen über die unbekannten stickstoffhaltigen Substanzen im Harn. Hoppe-Seylers Zschr. für physiol.Chem. (1932) 210, Seite 33
67. Borsook, H. und Dubnoff, J.W.
Ornithin- catalysed urea formation in Liver homogenate. J.biol.Chem. (1947) 69, Seite 461
68. Kamin, H. und Handler, P.
The metabolism of parenterally administered amino acids II. Urea Synthesis. J.biol.Chem. (1951) 188, Seite 193
69. Meister, A. Enzymatic Transfer of Alpha-Amino-groups. Science (1954) 120, Seite 43
70. Meister, A. und Tice, S.V.
Transamination from Glutamine to α -keto acids. J.biol.Chem. (1950) 197, Seite 173
71. Meister, A.; Sober, H.A.; Tice, S.V. und Fraser, R.E.
Transamination and associated Deamidation of Asparagin and Glutamin. J.biol.Chem. (1952), 197, 319
72. Harper
Review of Physiol.Chem., Lange Los Altos Calif. (1961)
73. Stetten, M.R.
Mechanism of the conversion of Ornithin into Proline and Glutamine acid invivo. J.biol.Chem. (1951) 189, S.499
74. Abrams, A. und Borsook, H.
The conversion of L-Histidine to Glutamine acid by liver enzymes. J.biol.Chem. (1952) 198, Seite 205
75. Wolf, G. The metabolism of α -C¹⁴-Histidine in the intact Rat. I. Radioactivity in amino acids from Protein. J.biol.Chem. (1953) 200, Seite 637
76. Chapeville, F. und Fromageot, P.
La formation de l'acide cystéinsulfonique à partir de la cysteine du rat. Biochimica et Biophysica Acta (1955) 17, S.275

77. Awapara, J. 2-Aminoethansulfine acid; an intermediate in the oxidation of cystine in vivo. *J. biol. Chem.* (1953) 203, Seite 183
78. Awapara, J. und Wingo, W.J.
On the mechanism of Taurine Formation from cystein in the rat. *J. biol. Chem.* (1953) 203, Seite 189
79. Schram, E. und Chrokaert, R.
Etude du Mëtabolisme de la Taurine du le rat. Formation de Sulfate. *Biochemica Biophysica Acta* (1957), 26, S.300
80. Fromageot, C.
The metabolsm of Sulfur and its relation to general Metabolism. The Harvey Lecture 1953-54
81. Cavallini, D.; Demarco, C. und Mondovi, B.
Chromatographic evidence on the occurence of Thiotaurin in the Urine of Rats fed with Cystine. *J. biol. Chem.* (1959) 234, Seite 854
82. Bremer, J. Species differences in the conjugation of Free Bile acids with Taurine and Glycine. *The Biochemical Journal* (1956) 63, Seite 507
83. Begeret, B. und Chataneger, F.
Utilisation D'echangeure D'ions pour la separation de Quelques Acides Amines Formes an cours de la degradation enzymatique de l'Acide cysteine sulfinique. Application à l'isolement de l'Hypotaurine (Acide 2-aminoethanesulfinique). *Biochimica et Biophysica Acta* (1954) 14, Seite 534
84. Bergmann, G. von
Die Überführung von Cystin in Taurin im tierischen Organismus. *Beiträge zur chem. Physiol.* (1904) 4, Seite 192
85. Embden, G. und Baldes, K.
Über den Abbau des Phenylalanins im tierischen Organismus. *Biochem. Zschr.* (1913) 55, Seite 301
86. Udenfried, S. und Cooper, J.R.
The enzymatic conversion of Phenylalanine to Tyrosine. *J. biol. Chem.* (1952) 194, Seite 503
87. Sakami, W. The Conversion of Glycin into Serine in the intact Rat. *J. biol. Chem.* (1949) 178, Seite 519

88. Lin, S.C. und Greenberg, D.M.
Enzymatic breakdown of Threonine by Threonine aldolase.
J.Gen.Physiology (1954) 38, Seite 181
89. Döcker, O. Die Behandlung chronischer Lebererkrankungen. Med.Welt
(1960) 29 (I), Seite 1079
90. Eger, W. Über den neuesten Stand der nekrotropen Leberschutzstoffe.
Med.Welt (1960) 29 (II), Seite 2249
91. Küchenmeister
Die moderne Behandlung diffuser Leberparenchymerkrankungen.
Ärztl. Praxis (1954) 6, Seite 3
92. Schettler, G. Über die Behandlung der Fettleber mit Lechitin. Dtsch.med.
Wschr. (1953) 78, Seite 264
93. Siede, W. Die Fettleber. Akt.Therap. (1961) 6, Seite 422
94. Schrade, W.; Biegler, R. und Böhle, E.
Die Veränderungen der essentiellen Fettsäuren des Blutes bei
verschiedenen Krankheiten, ihre Bewertung und ihre Bedeu-
tung für die Ernährung. Schweiz.med.Wschr. (1959) 89,
Seite 117
95. Hevesy, G. und Hahn, L.
Phosphatide exchange between plasma and organs. Nature
(London) (1939) 144, Seite 204
96. Hartmann, F. und Hess, R.G.
Untersuchungen über die Bedeutung des Lechitin in Fettstoff-
wechsel an der experimentellen Fettleber der Ratte. Dtsch.Z.
Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (1958) 18, S.155
97. Nissen, K. Fortschritte auf dem Gebiet der Verdauungskrankheiten. Land-
arzt (1960) 36 (I), Seite 62
98. Schön, H. Zur Frage der Verwendung von Ölen in der diätetischen The-
rapie degenerativer Gefässerkrankungen. Med.Klin. (1959)
54, Seite 1394
99. Hartmann, F. Einige Grundprobleme der Störung der Leberfunktion bei der
Hepatitis und ihren Folgezuständen. Verh.dtsch.Ges.inn.
Med. (1957) 63, Seite 213
100. Schettler, G. Die Therapie der Virus Hepatitis und ihrer Folgezustände.
Ther.d.Gegenw. (1962) 101, Seite 197

101. Knauff, H.G.; Georgii, A. und Matzen, K.
Der Einfluss von Cholinphospholipiden auf das Spektrum der freien Plasmaamino-säuren bei toxischen Leberschäden. Klin. Wschr. (1963) 41, Seite 915
102. Foster, G.L.; Rittenberg, D. und Schoenheimer, R.
Deuterium as an indicator in the study of Intermediary metabolism. XIV. Biological formation of Deuteramino acids. J. biol. Chem. (1938) 125, Seite 13
103. Foster, G.L.; Schoenheimer, R. und Rittenberg, D.
Studies in Protein metabolism. V. The utilization of Ammonia for amino acid and creatine formation in animals. J. biol. Chem. (1939) 127, Seite 1319
104. Bender, A.E. und Krebs, H.A.
The oxydation of various Synthetic α -amino acids by Mammalian D amino-acid-oxidase L amino-acid-oxidase of cobra Venom and the L and D amino-acide-oxidases of *Neurospora crassa*. Biochemical Journal (1950) 55, Seite 210
105. Welty, J.D.; Read, W.O. and Shaw, E.H.
Isolation of 2-hydroxyethane sulfonic acid (isethionic acid) from dog heart. J. biol. Chem. (1962) 237, Seite 1160
106. Read, W.O. and Welty, J.D.
Synthesis of taurine and isethionic acid by dog heart slices. J. biol. Chem. (1962) 237, Seite 1521

LEBENS LAUF

Am 30. Januar 1926 wurde ich in Budapest, Ungarn, als erste Tochter der Familie Villanyi geboren. Mein Vater Andreas Villanyi, Oberstleutnant im Königlichen Ungarischen Generalstab, war Professor für Physik und Chemie sowie Nachrichtenwesen an der Ludovica-Militär-Akademie in Budapest. Zur Zeit ist er als Physiker in Los Angeles, Californien, tätig.

Nach 4 Jahren Grundschulbesuch trat ich 1936 in das Patrona Hungariae Gymnasium in Budapest ein. Nach Verlassen Budapests infolge der Kriegereignisse im März 1944 legte ich die Matura im Benediktiner-Gymnasium St. Mor in Papa im April 1944 ab.

Im Oktober 1944 begann ich das Medizin-Studium an der Königlichen Peter Pazmany-Universität in Budapest. Im März 1945 floh ich mit meiner Familie nach Bayern. An der Aussenstelle der medizinischen Fakultät München in Regensburg setzte ich das Medizin-Studium fort und legte im August 1947 das Vorphysikum und im September 1948 das Physikum ab.

Im Jahre 1949 übersiedelte ich mit meiner Familie nach Los Angeles in Californien. Dort besuchte ich die University of Southern Calif. von 1951 bis 1953, wo ich den Bachelor of Science in Biochemie erwarb. Von 1953 bis 1959 arbeitete ich in verschiedenen Forschungsinstituten.

1959 setzte ich das Medizin-Studium an der Universität München fort, wo ich im Frühjahr 1963 das Staatsexamen ablegte.

Seit 20. September 1945 bin ich mit Stan S. Hardy, Rechtsanwalt, zur Zeit Bibliothekar in Los Angeles, verheiratet; im März 1948 wurde unsere Tochter geboren.

